



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 5/00, A01N 1/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/14395 (43) Date de publication internationale: 17 mai 1996 (17.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01435 (22) Date de dépôt international: 31 octobre 1995 (31.10.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/13249 4 novembre 1994 (04.11.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cédex 05 (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): SALZMANN, Jean-Loup [FR/FR]; 18, boulevard Voltaire, F-75011 Paris (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i>
(54) Title: CULTURED EUKARYOTIC CELL DISSOCIATION METHOD (54) Titre: PROCEDE DE DISSOCIATION DES CELLULES EUCARYOTES EN CULTURE (57) Abstract <p>A method for preparing adhesive eukaryotic cells by means of at least one step of collecting the cells after they have grown, and optional steps of freezing and thawing said cells, wherein the preparation solutions contain at least one polysaccharide polymer derivative.</p> (57) Abrégé <p>Procédé de préparation des cellules eucaryotes adhérentes comportant au moins une étape de recueil des cellules après leur croissance complétée le cas échéant par des étapes de congélation et de décongélation desdites cellules, caractérisé en ce que les solutions de préparation contiennent au moins un dérivé d'un polymère polysidique.</p>		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDE DE DISSOCIATION DES CELLULES EUCARYOTES EN CULTURE

La présente invention est relative à une amélioration des procédés de recueil et de manipulation des cellules eucaryotes adhérentes ou de tissus
5 cultivés.

La culture cellulaire est actuellement un des passages obligés des techniques de génie génétique soit pour exprimer des protéines recombinantes, soit lorsque ces cellules ont été transfectées par des virus recombinants, comme cellules hôtes administrables en thérapie génique. Dans ce dernier cas il arrive
10 qu'on réimplante directement des cellules transfectées par des vecteurs viraux ou rétroviraux dans des tissus ; une revue de ces différentes techniques est donnée dans l'ouvrage intitulé « Thérapie génique, l'ADN médicaments » coordonné par Axel Kahn, Editeur John Libby, (1993); on pourra également se référer utilement à l'article de RC. MULLIGAN, Science (1993), Vol. : 260, p 926.

Le rendement en cellules viables est un point critique lorsque l'on cultive
15 des cellules eucaryotes tant pour la qualité même des cellules ou des produits qui en sont obtenus que pour les questions de rendement lesquels jouent à la fois sur les quantités de produits obtenus et sur le prix de revient dudit produit ; en particulier lorsqu'une thérapie génique est réalisée par injection des cellules, par exemple des cellules d'emballage, contenant un virus ou rétrovirus
20 recombinant, le titre infectieux du virus ou du rétrovirus dépendant directement de l'état physiologique des cellules d'emballage et de leur concentration.

Les cellules adhérentes sont souvent utilisées en culture cellulaire pour la production de produits soit sécrétés par ces cellules soit en tant que tel en
25 thérapie génique ; les exemples les plus classiques sont soit les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary Cells) pour la production de molécules recombinantes ou récepteurs clonés ou d'autres cellules fibroblastiques utilisées en thérapie génique et en particulier des cellules dérivées de 3T3 telles NIH-3T3.

Pour décoller les cellules de leur support, différentes techniques
30 physiques (raclage) ou chimique (chélateurs de type EDTA ou enzymes protéolytiques de type trypsine) ont été employées. Ces techniques présentent toutes des inconvénients.

L'utilisation de moyens physiques ou de chélateurs tels l'EDTA est délicate et entraîne l'apparition d'agrégat ainsi qu'une diminution de la viabilité ; les enzymes protéolytiques comme la trypsine dégradent les protéines de surface de la cellule, diminuent la viabilité et perturbent leur propriété biologique
5 sans même supprimer totalement la présence des agrégats, conduisant à des taux d'infectivité plus faibles qu'ils ne pourraient l'être ; les cellules ne disposent plus des glycoprotéines de surface leur permettant de produire des rétrovirus à un titre optimum.

C'est le cas par exemple de l'utilisation de cellules d'emballage NIH-
10 3T3 qui sont des fibroblastes de souris utilisées en thérapie génique, et cultivées sur supports plastiques pour être ensuite collectées et injectées directement dans des tumeurs ; le principe de ce type de thérapie est de faire produire par des dérivés particuliers de cellules NIH-3T3, appelées cellules M11, in vivo au sein des tumeurs, des rétrovirus thérapeutiques ; à titre d'exemple d'un tel
15 traitement on se référera aux articles de M. Caruso et al dans Proc Nat. Acad. Sci. USA, (1993) 90 : 70-24, 70-28 ; ou KW Culver et al, Science 256 n° 5063 p. 1550-1551-(1992). L'intégrité et la capacité de ces cellules à produire des virus sont donc primordiales pour l'efficacité thérapeutique du traitement.

Les agrégats présentent toute une série d'inconvénients dont les plus
20 importants sont d'entraîner une sous-estimation du nombre des cellules et une très mauvaise reproductibilité des comptages cellulaires. De plus la présence d'agrégats perturbe les procédés de congélation indispensables au bon stockage des cellules, les cellules situées au centre des agrégats, n'étant pas atteintes par les produits de conservation tels le diméthyl-sulphoxide (DMSO) ce
25 qui les rend plus fragiles et entraîne une mortalité supérieure. Enfin les agrégats perturbent la diffusion des cellules quand elles sont injectées au sein des tissus ou de tumeurs au cours de traitements de thérapie génique.

Les dispositifs permettant la culture cellulaire en masse de cellules eucaryotes adhérentes sont de différents types, le principe étant toujours d'avoir
30 une surface maximale permettant l'adhésion des cellules sur cette dernière ; on pourra citer à titre d'exemple et comme étant les plus fréquentes :

- les bouteilles roulantes (roller bottles) dans lesquelles les cellules tapissent une paroi cylindrique des bouteilles,

- les appareils dits « multi tray » constitués d'une série de plaques superposées sur lesquelles s'attachent les cellules et baignant dans le milieu de culture, ou encore de type CellCube,
- des micro-porteurs ou micro-billes tels ceux commercialisés par la société Pharmacia sous les marques Cytodex 1, 2 ou 3 ou encore Cytopore,
- différents systèmes existants comportant des cartouches de fibres creuses dans lesquelles les cellules sont logées à titre d'exemple, parmi lesquels on peut citer les systèmes de type Cellmax, Endotronix.

Lorsque l'on veut récupérer des cellules pour quelque motif, notamment pour constituer des banques cellulaires, pour les réensemencer, ou encore pour les utiliser à titre d'agents thérapeutiques, la succession d'étapes est la suivante:

- a) la culture des cellules ou tissus en milieu nutritif ,
- b) l'élimination du milieu de culture de cellules,
- c) l'addition d'un milieu de dissociation comprenant un chélateur ou un enzyme protéolytique, ou une combinaison des deux,
- d) une ou plusieurs étapes de lavage dans un milieu approprié à l'utilisation que l'on souhaite faire de ces cellules.

Si ces cellules sont destinées à être congelées, elles sont reprises dans un milieu contenant du DMSO de 5 à 20 % et du sérum de veau fœtal de 30 à 70 % ; les cellules congelées sont ensuite décongelées par resuspension dans un milieu composé de sérum physiologique auquel est ajoutée de l'albumine à 10 % et les cellules sont ensuite lavées et centrifugées plusieurs fois dans le même milieu jusqu'à reprise du culot cellulaire dans le milieu final adapté à leur utilisation.

Le problème de la conservation de ces cellules à l'état isolé, en ayant leur intégrité membranaire et conservant une viabilité maximale est un problème aujourd'hui non résolu. L'invention résout ce problème en présentant un procédé de préparation de cellules eucaryotes adhérentes comprenant au moins une des étapes citées ci-dessus incluant celle de culture elle-même et consistant en l'addition dans une solution au contact des cellules pendant l'une de ces étapes un dérivé d'un polymère polyosidique. De façon préférée ce polymère polyosidique est un polysaccharide et de préférence un polysaccharide sulfaté ; des exemples de tels polysaccharides sulfatés sont par exemple l'héparine, le

dextran sulfate, ou le sulfate d'hydroxy- éthyl-amidon. Un polysaccharide selon l'invention à ajouter dans les solutions de traitement des cellules eucaryotes a un poids moléculaire compris de préférence entre 5000 et 500 000. L'héparine de poids moléculaire 20 000 constitue un cas particulier particulièrement efficace dans le procédé de l'invention. L'héparine est actuellement connue et utilisée comme anti-coagulant. Plusieurs médicaments à base d'héparine ou de dérivés d'héparine ont reçus une autorisation de mise sur le marché pour cette indication.

Mais l'avantage de l'addition d'héparine dans le procédé de l'invention ne peut être expliqué par un mécanisme physiologique tel celui impliqué dans la coagulation ou l'hémostase.

La dose de polysaccharides sulfatés à ajouter dans le procédé de l'invention est de 50 à 500 unités par ml et de préférence de 75 à 150 unités par ml, quand le milieu est une solution de dissociation contenant un chélateur ou une enzyme (étapes b) à d)).

Cette dose est de 500 à 5000 UI/ml quand le polysaccharide est ajouté directement dans le milieu de culture des cellules ou des tissus (étape a)), et de préférence 800 à 2000 UI/ml ; une concentration d'environ 1600 UI/ml peut être considérée comme optimale.

Cet effet des polysaccharides sulfatés sur la prévention de l'agrégation des cellules adhérentes ne peut pas être expliqué ni par ses propriétés anti-agrégantes connues, ni par son action bien connue d'inhibition de la transformation de la prothrombine en thrombine.

De fait, l'action de l'héparine sur les capacités d'adhésion des cellules à leur support est encore mal comprise et les rares résultats publiés contradictoires. Parfois, l'addition d'héparine dans le milieu de culture entraîne une agrégation accrue des cellules (heparin induced agregation of lymphoid cells : J. Cell. Physiol. 1986, 126, 352-358), parfois l'héparine entraîne un détachement des cellules ou une inhibition de leur accrochage à des substrats artificiels (heparin inhibits the attachment and growth of BALB/C/3T3 fibroblasts on collagen substrata, J. Cellular Physiol. 1992, 150, 8-16).

L'invention est également relative à l'utilisation d'un dérivé de polymère polyosidique, notamment des polysaccharides sulfatés dans le milieu de culture,

dans un milieu de dissociation ainsi que dans les milieux de congélation ou de décongélation de cellules eucaryotes adhérentes ou de tissus en culture. L'héparine, le dextran sulfate ou le sulfate d'hydroxyéthyl-amidon sont des polysaccharides sulfatés préférés de l'invention. Cette utilisation permet :

- 5 - d'obtenir une meilleure dissociation des cellules,
- d'obtenir ces cellules avec un rendement supérieur à celui obtenu par les méthodes classiques,
- de diminuer la taille et le nombre des agrégats qui subsistent après l'étape de dissociation,
- 10 - d'obtenir une meilleure reproductibilité dans les comptages cellulaires.
- d'optimiser les procédures de congélation ou de décongélation et d'injection (lorsque c'est leur utilisation finale) de ces cellules.

Quand le dérivé de polymère est utilisé dans le milieu de dissociation des cellules ou de tissus et contenant soit un chélateur, soit une enzyme

15 protéolytique, soit les deux, la dose optimale est comprise entre 75 et 150 UI/ml.

Quand le dérivé de polymère est utilisé directement dans le milieu de culture, sa concentration optimale est comprise entre 500 et 5000 UI/ml, de préférence entre 800 et 2000 UI/ml avec une concentration optimale autour de 1600 UI/ml. L'avantage de cette dernière solution se situe, d'une part, au niveau de

20 l'augmentation de la viabilité des cellules qu'elle permet et, d'autre part, de l'économie de moyens pour aboutir à la récolte des cellules en culture ou des tissus en évitant l'étape de dissociation ; en effet, une simple étape de centrifugation, le cas échéant suivie d'une étape de lavage, est suffisante à l'obtention d'un culot cellulaire prêt à une congélation éventuelle.

25 L'invention est également relative aux cellules eucaryotes obtenues par la mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus, ainsi qu'aux produits issus de ces cellules ou tissus, notamment des virus, protéines recombinantes ou des récepteurs.

Des exemples particuliers de ce type de cellules sont notamment : des

30 cellules L, la lignée 3T3 NIH, les lignées d'encapsidation Ψ CRE et Ψ CRIP, les cellules TS13 (cellules de hamster), les cellules tumorales MC26, les cellules tumorales 143b, les cellules tumorales MDF7, les cellules tumorales B16 F1, les

lignées de packaging GP + envAM12, les cellules HeLa. Un exemple de tissu en culture est celui de monocouches de kératinocytes.

L'utilisation des cellules eucaryotes recombinantes ou transformées pour utilisation en thérapie génique prend actuellement de plus en plus d'importance et les volumes à produire également. Le procédé de l'invention est considérablement amélioré lorsque après la première étape de dissociation des cellules, le reste du processus de traitement, suspension, re-suspension, lavages sont effectués à la température de 4°C au lieu d'être effectués à température ambiante. Aussi le procédé tel que décrit ci-dessus est-il particulièrement avantageux quand l'ensemble de ces étapes intermédiaires, sont réalisées à 4°C.

L'utilisation de ces types de cellules étant essentiellement à but thérapeutique chez l'homme, il est intéressant de souligner que les polysaccharides sulfatés tels que ceux cités plus haut sont des produits qui ont déjà obtenus une autorisation de mise sur le marché et à ce titre ne posent a priori aucun problème de toxicité si des résidus potentiels restent associés aux cellules.

Dans le mode de réalisation du procédé de la présente invention où l'adjonction d'héparine se situe entre 500 et 5000 UI/ml dans le milieu de culture et de préférence entre 800 et 2000 UI/ml, lorsque les cellules arrivent à confluence, les cellules sont dissociées sans effectuer les étapes d'élimination du milieu de culture, ni addition de milieu dissociant contenant notamment un chélateur de type EDTA. Un avantage de ce mode de réalisation particulier est l'augmentation de la viabilité de la cellule ; en effet, l'EDTA qui entraîne une certaine mortalité cellulaire n'est plus nécessaire. Dans ce mode de réalisation, l'héparine ajoutée directement au milieu de culture est laissée en présence des cellules pendant 5 à 10 minutes ; les cellules sont alors facilement dissociables par une agitation modérée suivie d'une remise en suspension par exemple à la pipette, et peuvent ensuite être recueillies. L'étape d, citée ci-dessus, de lavage dans un milieu appropriée à l'utilisation que l'on souhaite faire de ces cellules, est toujours possible ultérieurement.

Ce type d'utilisation permet d'améliorer grandement les procédés utilisés pour le recueil des cellules en flacons roulants quant le nombre de flacons à récupérer

est important. Ceci entraîne notamment une économie de manipulations qui permet de rendre viable un process industriel qui sans cela ne l'aurait pas été. A titre d'exemple, pour recueillir les cellules de 50 flacons roulants suivant un procédé de dissociation classique, il faut utiliser 6 personnes qui travaillent dans un espace réduit pendant une durée de 2 à 3 heures. Avec le nouveau procédé, 2 personnes suffisent, sans augmentation de durée. Cette amélioration est extrêmement sensible lorsqu'il s'agit de passer à 100 flacons roulants où le procédé de dissociation avec changement de milieux devient quasiment impossible à cause du trop grand nombre de personnes présentes dans une salle à atmosphère contrôlée. Enfin, l'augmentation de la viabilité des cellules en l'absence d'EDTA augmente la qualité et la quantité du produit obtenu à partir des cellules ou tissus dissociés.

Les expériences ci-dessous sont des exemples donnés à titre indicatif de l'amélioration conférée par le procédé de l'invention dans la qualité et le rendement des cellules obtenues ainsi que dans l'amélioration du titre infectieux des cellules dérivées de fibroblaste de souris transfectées par des rétrovirus recombinants tels que les cellules de packaging Ψ CRIP (Danos O. et al, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 85 : 64,60-64-64 (1988). Ces expériences sont destinées à illustrer les performances du procédé de l'invention sans pour autant être limitées ni aux types cellulaires donnés, ni à la méthode de culture utilisée, ni au milieux, tampons ou traitement des cellules utilisées à partir de l'étape de dissociation.

Tous les exemples ci-dessous sont réalisés en utilisant comme polysaccharides sulfatés l'héparine telle que commercialisée par la société Choay (Sanofi Winthrop, 9, rue du Président Allend, 94958 Gentilly Cedex), l'héparine lyophilisée étant remise en solution dans de l'eau distillée stérile et à raison de 25 000 unités par ml.

Les cellules utilisées sont des cellules de type fibroblastique dérivées de NIH-3T3 transfectées par un rétrovirus recombinant de type Moloney intégrant dans son génome le gène de la thymidine kinase, et décrit dans Caruso et al 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 : 7024-7028, et appelées cellules M11.

Exemple n° 1: Effet de l'addition d'héparine sur le nombre de cellules dissociées et collectées.

La croissance des cellules est menée à confluence en bouteilles roulantes jusqu'au 6ème ou 8ème jour (J6 ou J8) de la production, puis le milieu de culture est jeté et les cellules sont mises en contact avec un milieu de dissociation constitué de tampon PBS auquel on ajoute 0,02 % d'EDTA. Les cellules sont ensuite comptées au Coulter counter à J6 ou J8 soit sans addition d'héparine soit avec addition de 100 unités par ml d'héparine ; les résultats sont présentés dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1 : Nombre des cellules récoltées par bouteilles roulantes

HEPARINE	0	100 U/ml
J6	124.10 ⁶	150.10 ⁶
J8	136.10 ⁶	164.10 ⁶

On voit que le nombre de cellules récoltées par bouteilles roulantes est 20% supérieur lorsque 100 unités par ml d'héparine sont ajoutées au milieu PBS-EDTA.

En outre lorsque l'on reprend les culots cellulaires en milieu de congélation, le nombre d'agrégats reformés est beaucoup plus faible qu'en l'absence d'héparine.

Exemple n° 2 : Congélation puis décongélation des cellules en absence ou en présence d'héparine.

Des boîtes de cultures de 75 cm² contiennent un tapis de cellules M11 en confluence.

Les cellules sont décollées de la boîte avec du milieu de dissociation PBS-EDTA 0,02 % avec ou sans héparine à 100 unités par ml.

Le milieu de dissociation est mis en présence du tapis cellulaire pendant 5 minutes puis les cellules sont récupérées et la dissociation est terminée avec une pipette de 5 ml. Les cellules sont alors comptées, centrifugées et le culot cellulaire repris dans un volume approprié de milieu de congélation composé de 50 % de sérum de veau nouveau-né (Hyclone référence A-2111) et 50 % de

milieu DME contenant 20 % de DMSO. Le milieu DME est le milieu DMEM (référence Gibco 41965) auquel on ajoute 6 ml de glutamine, 6 ml de solution d'antibiotique (pénicilline, streptomycine, néomycine (Référence GIBCO 15640-048) et 10 % de sérum de veau nouveau-né. Les cellules sont congelées
5 finalement dans 50 % de sérum de veau nouveau-né et 10 % de DMSO dans le DME.

Protocole de décongélation :

Les ampoules contenant les cellules congelées dans le milieu décrit ci-dessus sont sorties de l'azote liquide et placées dans la glace puis transférées
10 dans un bain-marie à 37° jusqu'à l'apparition d'un premier glaçon, moment propice au transfert dans un tube falcon de 15 ml contenant 10 ml de milieu constitué de sérum physiologique auquel on ajoute 10 % d'albumine humaine. Les cellules sont ensuite lavées deux ou trois fois avec ce même milieu puis le
15 culot cellulaire est remis en suspension dans un volume adéquat de DME (tel que défini ci-dessus) contenant 10 % de sérum de veau nouveau-né puis la suspension cellulaire est distribuée à nouveau dans des flacons de culture, la culture se faisant dans des conditions classiques à 37° en présence de 5 % de CO₂.

Le tableau 2 ci-dessous résume les résultats obtenus dans les conditions
20 expérimentales suivantes :
lors de leur croissance après décongélation le milieu de culture DMEM contient de 0 à 100 unités par ml d'héparine puis les cellules sont récoltées en tampons PBS-EDTA avec ou sans 100 unités d'héparine.

Les paramètres mesurés sont le nombre de cellules vivantes, la viabilité,
25 la densité des cellules dans les flacons, le temps de doublement, le nombre de doublement.

Tableau 2

Nbe d'UI d'héparine ds 30 ml de DMEM	0		25 U/ml						50 U/ml			75 U/ml		100 U/ml	
	1000	0	1000	1000	0	0	0	0	1000	1000	0	1000	0	000	0
Nbe d'UI d'héparine ds 10 ml de PBS EDTA															
Nbe de C vivantes (x10 6)	3,2	2,1	2,33	2,36	2,48	1,74	1,96	2,64	1,44	2,48	1,98	1,32	1,6	1,03	
Viabilité	90%	72%	91%	86%	86%	75%	87%	92%	89%	91%	83%	80%	83%	82%	
Nbe de C vivantes par cm 2	0,042	0,028	0,031	0,032	0,033	0,023	0,026	0,035	0,019	0,019	0,026	0,018	0,021	0,014	
Temps de dédoublément	66h	6j	4,7J	4,5j	4,1j	14j	7,8j	3,7	-	4,1j	7,5j	-	-	-	
Nbe de doublément	1,09	0,48	0,63	0,65	0,72	0,21	0,38	0,81	-	0,72	0,4	-	-	-	
Confluence	2+(+)	2+ (+)	2+(+)	2+(+)	2+(+)	2+(+)	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	

Il apparaît clairement que la présence d'héparine dans le milieu de croissance apparaît défavorable au nombre de cellules vivantes obtenues après récolte.

Par contre la présence d'héparine dans le milieu de décollement augmente de façon très significative le nombre de cellules vivantes, la viabilité,
5 la densité des cellules.

A l'observation microscopique des cellules à J3, il apparaît que le nombre de cellules en suspension augmente avec la concentration en héparine du milieu et inversement le tapis cellulaire est moins dense.

Les cellules cultivées en présence d'héparine puis traitées en PBS et
10 D'EDTA sans héparine présentent un phénomène de décollement du tapis cellulaire ce qui fausse les comptages obtenus à partir du tapis décollé et diminue de fait le rendement des cellules obtenues.

Cet exemple montre clairement que la présence d'héparine dans le milieu PBS-EDTA et dans les milieux de congélation, décongélant confère aux
15 cellules un taux de viabilité de 90 % et un rendement en cellules vivantes bien supérieur à celui obtenu en absence d'héparine.

Exemple n° 3 : titre infectieux des cellules en culture ayant été en contact de l'héparine pendant les différentes phases de récolte, congélation et décongélant telles que décrites dans les exemples ci-dessus.

20 Le calcul du titre infectieux a été réalisé selon la méthode décrite dans Caruso et al, Proc Nat Acad Sci (1992) 89 : 182-186. Des cellules L en culture ont été infectées avec les lignées M11 récoltées de la façon décrite dans les exemples ci-dessus. Les cellules L infectées par les cellules M11 sont ensuite colorées au bleu trypan.

25 La mesure du titre infectieux de ces cellules est identique ou supérieure à celui obtenu en milieu PBS-EDTA simple, et constamment supérieure si on rapporte le titre au nombre de cellules effectivement comptées ; il est également significativement supérieur au titre de cellules recueillies avec de la trypsine. En outre avec l'utilisation de la trypsine il est constant que le titre infectieux soit nul
30 jusqu'à la quatrième heure alors que en présence de PPS et d'EDTA auquel on ajoute 100 unités par ml d'héparine, un titre infectieux apparaît dès la première heure après la mise en présence des cellules L avec les cellules M11.

Ces résultats reflètent bien que les cellules M11 sont dans un meilleur état physiologique lorsque les cellules ont été préalablement mises en présence d'héparine lors des étapes de recueil, congélation et décongélation que lorsqu'elles ont été seulement en présence de D'EDTA ou de trypsine ou d'un
5 mélange des deux.

Exemple n° 4 : comparaison de l'effet de faibles et fortes concentrations d'héparine sur la dissociation de différentes lignées cellulaires en culture.

L'utilisation d'héparine a été testée quant à la dissociation de différentes lignées cellulaires. On peut citer la lignée 3T3 NIH, les lignées d'encapsidation ΨCRE et
10 ΨCRIP, les cellules TS13 (cellules de hamster), les cellules tumorales MC26, les cellules tumorales 143b, les cellules tumorales MCF7, les cellules tumorales B16 F1, les lignées de packaging GP + envAM12, les cellules Hela.

a) concentration d'héparine à 100 UI/ml dans un milieu PBS EDTA, à pH8 :

15 Le temps de dissociation pour la concentration d'héparine à 100 UI/ml est de 5 minutes à température ambiante. La dissociation de ces cellules est d'autant plus facile que celles-ci sont proches de la confluence.

Si l'on augmente la concentration d'héparine à 200 UI/ml environ, la viabilité est légèrement accrue : elle est de 87 % alors que à 100 UI/ml elle était à 83 %.

20 b) Héparine utilisée à une concentration comprise entre 800 UI/ml et 2000 UI/ml.

L'héparine est ajoutée directement dans le milieu de culture des cellules à la concentration de 1200 UI/ml, la viabilité des cellules après dissociation est alors de 95 %.

25 Exemple n° 5 : utilisation d'héparine pour la dissociation de cellules en culture dans du milieu sans sérum.

L'expérience a été réalisée en utilisant des cellules de type MDCK qui doivent pousser dans un milieu sans sérum pour pouvoir produire des quantités appréciables de virus grippal après un traitement approprié. Malheureusement,
30 ce type de lignée cellulaire cultivée sans sérum rend la dissociation des cellules extrêmement difficile. La procédure habituelle est un traitement par un tampon PBS EDTA pendant 30 minutes, suivi d'une dissociation très énergique à la trypsine. Cette difficulté à dissocier les cellules est un frein important à

l'utilisation industrielle de ce type de culture cellulaire pourtant indispensable à la fabrication du vaccin grippal. Avec le procédé de l'invention, l'étape de pré-incubation avec le PBS EDTA a été remplacée par l'adjonction d'héparine à haute dose (1200 UI/ml) dans le milieu de culture. Dans la plupart des cas, il a été observé une très importante augmentation de la dissociation ultérieure en présence de trypsine et, dans certains cas, les cellules ont pu être dissociées sans l'adjonction de trypsine.

Exemple n° 6 : Détachement de monocouches de cellules épithéliales.

La reconstitution de l'épiderme des grands brûlés est obtenue par culture in vivo de kératinocytes qui se disposent en couches monocellulaires sur les boîtes de culture. La procédure habituellement utilisée pour récupérer ces monocouches est une digestion énergique à la trypsine suivie d'un décollement physique. L'utilisation d'héparine remplace avantageusement l'utilisation de la trypsine, d'une part, car l'héparine altère moins les protéines à la surface de ces cellules, d'autre part, l'héparine est beaucoup moins chère et d'usage humain (il existe une AMM) alors que la trypsine doit, pour pouvoir être utilisée nécessiter de nombreux contrôles bactériens et viraux qui en font un produit extrêmement cher.

En conclusion l'addition d'une quantité de polysaccharides sulfatés telle l'héparine à une concentration de 50 à 500 unités par ml et de préférence une centaine d'unités par ml dans les milieux de manipulation des cellules adhérentes utilisés lors de leur recueil, de la congélation, ou de la décongélation, ou d'une quantité de 500 à 5 000 UI/ml dans le milieu de culture permet d'augmenter la viabilité et le nombre absolu de cellules vivantes obtenues ; de façon concomitante il est observé une diminution des agrégats et un comportement physiologique des cellules plus vigoureux puisqu'il est observé une augmentation de l'infectiosité des cellules transformées par un rétrovirus.

Enfin ces conditions expérimentales permettent de faire les opérations de collecte des cellules à une température de 4°, ce qui permet d'envisager un traitement homogène de quantité importante de cellules ce qui est nécessaire lors de la préparation de lots thérapeutiques.

Il est particulièrement intéressant de noter que l'utilisation de substances telles l'héparine ou l'hydroxy-éthyl-amidon ont déjà reçu des AMM pour des

- utilisations thérapeutiques et notamment comme anti-agrégant pour le premier ou comme substitut plasmatique pour l'autre, ce qui laisse penser que l'utilisation des milieux les contenant ne poserait pas de problème majeur au niveau de la constitution de dossier d'enregistrement clinique de nouveaux
- 5 produits thérapeutiques à base soit des cellules dans le cas d'une thérapie génique soit de substances excrétées par la cellule dans le cas de protéines recombinantes.

Revendications

1. Procédé de préparation des cellules eucaryotes adhérentes ou de
5 tissus cultivés comprenant au moins une étape de recueil des cellules après leur
croissance complétée le cas échéant par des étapes de congélation et de
décongélation desdites cellules, caractérisé en ce que l'un des milieux de
préparation contiennent au moins un dérivé d'un polymère polyosidique.

2. Procédé selon la revendications 1 caractérisé en ce que le polymère
10 est ajouté au milieu au moins dans l'une des étapes suivantes : la culture, la
dissociation et le recueil des cellules, leur congélation, leur décongélation.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le
polymère est un dérivé de polysaccharide.

4. Procédé selon la revendication 1 à 3 caractérisé en ce que le polymère
15 est une polysaccharide sulfaté dont le poids moléculaire est compris entre 5000
et 500 000.

5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que le polymère est
choisi de préférence parmi l'héparine, le dextran sulfate ou la sulfate
d'hydroxyéthyl amidon.

20 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le
polymère est l'héparine.

7. Procédé selon des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que le
polymère est ajouté au milieu de culture à une concentration comprise entre 500
et 5000 UI/ml, et de préférence entre 800 et 1600 UI/ml.

25 8. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que le polymère est
ajouté au milieu de dissociation contenant un autre agent dissociant, à une
concentration comprise entre 75 et 150 UI/ml.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que les
étapes intermédiaires entre celle de dissociation, de congélation et de
30 décongélation sont réalisées à 4°C.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que le
système de culture est un système en circuit fermé dans lequel les cellules sont

dissociées puis récupérées, notamment un système de type Cell Cube, ou des fibres creuses, ou des microporteurs.

11. procédé selon d'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que les cellules adhérentes sont des cellules de type fibroblastiques ou épithéliales.

5 12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules recombinées susceptibles de produire une protéine recombinante ou un récepteur.

13. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules hôtes comprenant un rétrovirus recombinant utilisable en
10 thérapie génique.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que les tissus en culture sont des monocouches de kératinocytes.

15. Cellules eucaryotes obtenues par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 14.

16. Produits issus des cellules eucaryotes de la revendication 15, notamment des virus, des protéines recombinantes ou des récepteurs.

17. Utilisation d'un dérivé des polymères polyosidiques dans les milieux de culture, de recueil, congélation ou décongélation de cellules eucaryotes adhérentes comme agent de dissociation de désagrégation desdites cellules.

20 18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisé en ce que le polymère est un polysaccharide polysulfaté.

19. Utilisation selon la revendication 18 caractérisé en ce que le polymère est l'héparine.

20. Utilisation selon l'une des revendications 17 à 19 caractérisée en ce
25 que le polymère polyosidique est ajouté au milieu de culture des cellules ou des tissus à la concentration de 500 à 5000 UI/ml, et de préférence de 800 à 1600 UI/ml.

21. Utilisation selon l'une des revendications 17 à 19 caractérisée en ce
30 que le polymère polyosidique est ajouté au milieu de dissociation contenant un autre agent dissociant à la concentration de 75 à 150 UI/ml.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/01435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N5/00 A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 142 344 (THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY) 22 May 1985 see page 5, line 9 - page 6, line 32 see page 8, line 8 - page 9, line 1; claims	1-7
A	WO,A,89 01028 (CETUS CORPORATION) 9 February 1989 see page 12, paragraph 27 - page 13, line 28; claims	1-21
A	US,A,5 348 877 (K.A. MCKEENNA ET AL.) 20 September 1994 see column 3, line 59 - line 68; examples 2,3	1-21
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 1996

Date of mailing of the international search report

15 MARCH 1996

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01435

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 150, no. 1, January 1992 NEW YORK, N.Y., US, pages 8-16, J.D. SAN ANTONIO ET AL. 'HEPARIN INHIBITS THE ATTACHMENT AND GROWTH OF Balb/c-3T3 FIBROBLASTS ON COLLAGEN SUBSTRATA.' see page 14, right column, line 5 - page 15, left column, line 30 -----</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01435

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-142344	22-05-85	CA-A- 1204399 US-A- 4994387 US-A- 5132223	13-05-86 19-02-91 21-07-92
WO-A-8901028	09-02-89	US-A- 5024947 AT-T- 105856 AU-B- 2126688 CA-A- 1309679 DE-D- 3889665 DE-T- 3889665 EP-A- 0380495 JP-T- 3500602	18-06-91 15-06-94 01-03-89 03-11-92 23-06-94 03-11-94 08-08-90 14-02-91
US-A-5348877	20-09-94	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No
PCT/FR 95/01435

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N5/00 A01N1/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 142 344 (THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY) 22 Mai 1985 voir page 5, ligne 9 - page 6, ligne 32 voir page 8, ligne 8 - page 9, ligne 1; revendications	1-7
A	WO,A,89 01028 (CETUS CORPORATION) 9 Février 1989 voir page 12, alinéa 27 - page 13, ligne 28; revendications	1-21
A	US,A,5 348 877 (K.A. MCKEENNA ET AL.) 20 Septembre 1994 voir colonne 3, ligne 59 - ligne 68; exemples 2,3	1-21
	- / - -	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Février 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15 MARS 1996

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 150, no. 1, Janvier 1992 NEW YORK, N.Y., US, pages 8-16, J.D. SAN ANTONIO ET AL. 'HEPARIN INHIBITS THE ATTACHMENT AND GROWTH OF Balb/c-3T3 FIBROBLASTS ON COLLAGEN SUBSTRATA.' voir page 14, colonne de droite, ligne 5 - page 15, colonne de gauche, ligne 30 -----</p>	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No

PCT/FR 95/01435

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-142344	22-05-85	CA-A- 1204399	13-05-86
		US-A- 4994387	19-02-91
		US-A- 5132223	21-07-92

WO-A-8901028	09-02-89	US-A- 5024947	18-06-91
		AT-T- 105856	15-06-94
		AU-B- 2126688	01-03-89
		CA-A- 1309679	03-11-92
		DE-D- 3889665	23-06-94
		DE-T- 3889665	03-11-94
		EP-A- 0380495	08-08-90
		JP-T- 3500602	14-02-91

US-A-5348877	20-09-94	AUCUN	
